

RECEIVED

OCT 1 1988

OFFICE OF PATENTS
UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

10/1/88



Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

J. Behrens, W. Birchmeier

Mittel zur Diagnose und zur Therapie von Tumorerkrankungen

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Wege zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen durch Ausnutzung molekularbiologischer Zusammenhänge bei der Tumorentstehung.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Kontrolle der Regulation von β -Catenin in Körperzellen zu entwickeln.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues Protein, welches an β -Catenin bindet und zu dessen zytoplasmatischen Abbau führt. Dieses Protein hat die Aminosäuresequenz gemäß Abb. 1 und wurde als **CONDUCTIN** bezeichnet.

Vom Vorkommen und der Wirkung des Conductins in Körperzellen abgeleitet werden Mittel zur Diagnose und zur Therapie von Tumorerkrankungen entwickelt.

Patentansprüche

1. Mittel zur Diagnose von Tumoren, enthaltend eine Substanz, mit der

- Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon bzw.
- Gene, die für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodieren, bzw.
- m-RNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden, nachgewiesen werden.

2. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend spezifische Antikörper gegen Conductin, seine Varianten oder Mutanten oder Teile davon.

3. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Antikörper monoklonale Antikörper sind.

4. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend korrespondierende Oligonukleotid-Primer bzw. DNA-Sonden zum Nachweis der Gene und deren Mutationen.

5. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend korrespondierende Oligonukleotid-Primer bzw. DNA-Sonden zum Nachweis der RNA-Sequenzen.

6. Mittel zur Therapie von Tumoren, enthaltend eine Substanz, die die Wirkung des Conductins im Körper aktiviert/reaktiviert.

7. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die den Genpromoter des Conductins aktiviert.

8. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die die Stabilität der mRNA-Sequenzen erhöht.

9. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die die

Aktivität des Conductins erhöht.

10. Conductin, seine Varianten und Mutanten sowie Teile davon.

11. Conductin nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 1-839 gemäß Abb. 1, wobei Abb. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

12. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 78-200 (RGS-Domäne) der Abb. 1.

13. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 343-464 (β -Catenin-Bindungsdomäne) der Abb. 1.

14. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 782-832 (Dishevelled Homologie-Region) der Abb. 1.

15. Teilsequenzen des Adenomatosis Poliposis Coli (APC), gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenzen 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 als RGS-Domänen-Interaktionsorte.

16. cDNA-Sequenz von Conductin, seiner Varianten oder Mutanten oder Teilen davon.

17. cDNA-Sequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1-3197 der Abb. 2, wobei Abb. 2 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

18. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 452-820 (RGS-Genabschnitt) der Abb. 2.

19. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1247-1612 (Genabschnitt der β -Catenin-Bindungsdomäne) der Abb. 2.

20. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 2564-2716 (Genabschnitt der Dishevelled Homologie-Region) der Abb. 2.

21. Verwendung des Conductin-Gens für die Gentherapie von Tumor rkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Vektor mit dem Conductin-Gen konstruiert wird, anschließend ein Gentransfer in den menschlichen Körper erfolgt und damit die Aktivität des Conductins in Körperzellen wiederhergestellt wird.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Wege zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen durch Ausnutzung molekularbiologischer Zusammenhänge bei der Tumorentstehung. Sie betrifft im einzelnen ein Mittel zur Diagnose von Tumorerkrankungen, und darauf aufbauend ein Mittel zur Therapie. Sie betrifft ferner das neue Protein Conductin, seine Mutanten und Varianten sowie Teile davon, die dazu analogen cDNA-Sequenzen und deren Verwendung in gentherapeutischen und pharmakologischen Verfahren.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Cadherine und Catenine bilden Zelladhäsionskomplexe, die in zahlreichen Geweben für die Anheftung der Zellen aneinander verantwortlich sind. Die Cadherine sind Transmembranproteine und stellen den direkten Kontakt zwischen benachbarten Zellen her. α -, β - und γ -Catenin sind zytoplasmatische Komponenten, die die Cadherine mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. Neben der Funktion bei der Zelladhäsion haben Catenine auch eine entscheidende Rolle bei Signaltransduktionsprozessen. β -Catenin in Vertebraten und das homologe Segmentpolaritäts-Genprodukt Armadillo in Drosophila werden durch den Wnt/Wingless-Signalweg stabilisiert (Nusse, R., Cell 89, 321-323, 1997). Dies führt zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen, nicht an Cadherin gebundenen Fraktion dieser Proteine, die daraufhin mit HMG-Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie wechselwirken können. Als Resultat wird β -Catenin/Armadillo in den Zellkern transportiert, wo es zusammen mit den LEF/TCF-Proteinen an DNA bindet und bestimmte Gene aktiviert (Behrens, J. et. al., Nature 382, 638-642, 1997).

Dieser Signalweg spielt auch eine Rolle bei der Tumorentstehung. In Kolonepithelzellen wird der zytoplasmatische Pool von β -Catenin durch das Tumorsuppressor-Genprodukt APC (Adenomatosis Polyposis Coli) streng reguliert. Mutationen von APC, wie sie in

etwa 80% aller Kolonkarzinome auftreten, führen zu verkürzten Formen des APC Proteins, die nicht mehr in der Lage sind β -Catenin zu destabilisieren. Dadurch findet man in diesen Tumoren permanente Komplexe von β -Catenin mit dem HMG-Transkriptionsfaktor TCF-4, welche für die Transformation der Zellen verantwortlich gemacht werden. Diese Theorie wird gestützt durch den kürzlichen Befund, daß in Tumoren, in denen APC nicht verändert ist, Mutationen von β -Catenin auftreten. Diese führen ebenfalls zur zytoplasmatischen Stabilisierung von β -Catenin und zur Assoziation mit LEF-1/TCF-Faktoren (Morin, P.J. et. al., Science 275, 1787-1790).

Die Erfindung hat das Ziel, einen neuen Weg zur Verhinderung der Tumorentstehung zu finden. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Kontrolle der Regulation von β -Catenin in Körperzellen zu entwickeln.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues Protein, welches an β -Catenin bindet und zu dessen zytoplasmatischen Abbau führt. Dieses Protein hat die Aminosäuresequenz gemäß Abb. 1 und wurde als CONDUCTIN bezeichnet.

Die Erfindung beruht nun auf dem Erkenntnis, daß Conductin über eine β -Catenin-Bindungsdomäne an β -Catenin und über eine sogenannte RGS-Domäne (Regulator of G-Protein Signalling) an APC-Fragmente bindet. Dadurch kommt es zum zytoplasmatischen Abbau von β -Catenin und in Vertebraten zur Blockade des Wnt/Wingless-Signalwegs. Damit ist klar, daß Conductin ein wichtiger Regulator der β -Catenin-Funktion ist und im Zusammenspiel mit APC zur Tumorsuppression beiträgt.

Davon abgeleitet betrifft die Erfindung ein Mittel zur Diagnose von Tumorerkrankungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß das Vorhandensein und die Menge von Conductin, seiner Mutanten und Varianten oder seiner Teile in Körperzellen nachgewiesen wird. Dieser Nachweis kann auf der Proteinebene mit spezifischen Antikörpern durchgeführt werden, speziell mit monoklonalen

Antikörpern.

Die Diagnose von Tumorerkrankungen kann gemäß der Erfindung auch auf der Genebene erfolgen. Dazu werden mit ausgewählten Primern und cDNA-Sonden, die aus der Gensequenz des Conductins abgeleitet sind,

- das Gen, das für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodiert, bzw.
- mRNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden, nachgewiesen.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Therapie von Tumorerkrankungen enthält Substanzen, die die Wirkung des Conductins im Körper aktivieren/reaktivieren. Das sind vor allem Mittel, die den Genpromoter des Conductins aktivieren bzw. Mittel, die die Stabilität der von den Conductin-Genen abgeleiteten m-RNA-Sequenzen erhöht. Das Hauptziel aller dieser Mittel besteht erfindungsgemäß darin, die Aktivität des Conductins in den Körperzellen zu erhöhen. Dazu kommen u. a. kleinmolekulare Substanzen in Betracht, die z. B. durch High-Througput-Number-Screening gefunden werden.

Die Erfindung umfaßt auch gentherapeutische Mittel, enthaltend Gene, die für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodieren, bzw. mRNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden.

Unter Schutz gestellt wird ferner das neue Protein Conductin gemäß Abb. 1, seine Mutanten und Varianten sowie Teile davon. Besonders bevorzugte Teilsequenzen sind die Aminosäuren 78-200 (RGS), 343-464 (β -Catenin-Bindungsdomäne) und 782-832 (Dishevelled Homologie-Region). Zum Schutzzumfang gehören auch Teilsequenzen des Adenomatosis Poliposis Coli (APC), gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenzen 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 als RGS-Domänen-Interaktionsorte.

Gleichermaßen beansprucht werden die analogen cDNA-Sequenzen,

insbesondere die volle cDNA-Sequenz des Conductins (Basenpaare 1-3197) gemäß Abb. 2 sowie die Teilsequenzen des Conductins der Nukleotidfolge 452-820 (RGS-Genabschnitt), der Nukleotidfolge 1247-1612 (Genabschnitt der β -Catenin-Bindungsdomäne) und der Nukleotidfolge 2564-2716 (Genabschnitt der Dishevelled Homologie-Region)

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Conductin wurde durch einen Hefe 2-Hybrid Screen als β -Catenin-Interaktionspartner identifiziert. Die vollständige cDNA-Sequenz wurde daraufhin isoliert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Conduction ist in Abb. 1 gezeigt, die Nukleotidsequenz in Abb. 2 und die Gegenüberstellung von Aminosäure- und Nukleotidsequenz in Abb. 3. Conductin besteht aus 839 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 92,4 kDa. Durch Sequenzvergleiche wurde im Conductin eine RGS-Domäne (Aminosäuren 78-200) und eine zu dem Protein Dishevelled verwandte Domäne (Aminosäuren 782-832, Dishevelled Homologie-Region) identifiziert (Abb. 1-3). Die β -Catenin-Bindungsdomäne (Aminosäuren 343-464) wurde durch Interaktionsstudien im 2-Hybrid-System entdeckt (Abb. 4). Es zeigte sich, daß diese Domäne ausreichend und notwendig für die Bindung an β -Catenin ist (Abb. 4), wohingegen die RGS- und Dishevelled Homologie-Region nicht beteiligt sind. Die Wechselwirkung von Conductin mit β -Catenin wurde auch in Co-Immunpräzipitationsexperimenten biochemisch bewiesen.

Die Wirkung von Conductin auf β -Catenin wurde in SW480 Zellen untersucht. In diesen Zellen ist das Tumor-Suppressor-Genprodukt APC mutiert, wodurch es zu einem Anstieg des cytoplasmatischen und vor allem nukleären Gehalts von β -Catenin kommt. Die Einbringung von Conductin in diese Zellen führt zu einem drastischen Abbau von β -Catenin, wodurch die Zelle von cytoplasmatischem und im Zellkern befindlichen β -Catenin depletiert wird (Abb. 4). Diese Wirkung auf den Gehalt β -Catenin

ist gleich stark wie die von nichtmutiertem APC, woraus geschlossen werden kann, daß Conductin ebenfalls als Tumorsuppressor durch Regulation von β -Catenin wirkt. Es wurde außerdem gezeigt, daß Conductin den Wnt/Wingless-Signalweg auch in Xenopus-Embryonen durch seine Wirkung auf β -Catenin hemmt.

Es wurde außerdem festgestellt, daß Conductin mit APC direkt interagiert. APC-Fragmente von Aminosäure 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2883 wurden als Interaktionsstellen für Conductin identifiziert. In Conductin erfolgt die Bindung an APC über die RGS-Domäne; dieser Bereich ist ausreichend und notwendig für die Interaktion. Die anderen Domänen in Conductin sind nicht beteiligt (Abb. 5).

Legende zu den Abbildungen:

Abb. 1 Aminosäuresequenz von Conductin

Die Conductin cDNA kodiert ein Protein von 839 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 92,4 kDa. Die RGS-Domäne (doppelt unterstrichen), die β -Catenin-Bindungsdomäne (einfach unterstrichen) und die Dishevelled Homologie-Region sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Abb. 2 Nukleotidsequenz von Conductin von Position 1-3199

Die Sequenzbereiche sind analog zu Abb.1 markiert.

Abb. 3 Gegenüberstellung von Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Conductin

Abb. 4 Analyse der Interaktion von Conductin und seinen Teilen mit β -Catenin

Das Conductin Protein und abgeleitete Teilstücke sind schematisch dargestellt. Hervorgehoben sind die RGS-Domäne (RGS) und die β -Catenin-Bindungsstelle (β -BD). Die Interaktion mit β -Catenin wurde im Hefe 2-Hybrid Assay untersucht und als β -Galaktosidase Einheiten quantifiziert. Man erkennt, daß die Bindung an β -Catenin auf die β -Catenin-Bindungsstelle beschränkt ist, die anderen Teile des Proteins tragen dazu nicht bei. Der Abbau von β -Catenin in SW480 Zellen durch Conductin wurde nach transienter Expression der angegebenen Proteine und Immunfluoreszenz-Färbung von β -Catenin analysiert. Nur Teilstücke von Conductin, die an β -Catenin binden, führen zu dessen Abbau.

Abb. 5 Analyse der Bindung von Conductin und seinen Teilen an APC

Die Bindung der APC Fragmente von Aminosäure 1464-1604 (APCfr.1)

und 1516-1595 (APCfr. 2) an Conductin und abgeleitete Teilstücke wurden im Hefe 2-Hybrid Assay untersucht und als β -Galaktosidase Einheiten quantifiziert. Die Analyse zeigt die ausschließliche Interaktion von APC mit der RGS-Domäne von Conductin. Vergleichbare Ergebnisse für die Bindung an die RGS-Domäne wurden mit APC Fragmenten von Aminosäure 1690-1778 und 1995-2883 erhalten.

MSSAVLVTLPLDPSSSFREDAPRPPVPGEEGETPPCQPSVGKVQSTKMPVSSNARNED 60
 GLGEPEGRASPDSPLTRWTKSLHSLGDDGAYLERTFLEREKCVDTLDFWFACNGFROM 120
NLKDTKTLRVAKAIYKRYIENNSVVSKOLKPATKTYIRDGIKKOOIGSVMFDOAQTEIOA 180
VMEENAYOVFLTSDIYLEYVRSGGENTAYMSNGGLGSLKVLGCGYLPTLNEEEEWTCADLK 240
 CKLSPTVVGLSSKTLRATASVRSTETAENGFRSFKRSDPVNPHYVGSYVFPATSANDS 300
 ELSSDALTDSDMSMTDSSVDGVPYPYRMGSKKQLQREMHRSVKKANGQVSLPHFPRTHRLPK 360
EMTPVEPAFAAEELISRLEKLELESRHSLEERLQOIREDDEEKEGSEQALSSRDGAPVO 420
HPLALLPPAAMKRTHKPFWTTTSPGSSRPPAVNPLVWVAIAHGPAPPTTTTSTTTISSVI 480
 PFFRLGASCPVAACPLLGGKSFLTKQTTKHVHHHYIHHHAVPKTKEEIEAEATQVRVRLC 540
 PGGTDYYCYSKCKSHPKAPEPLPGEQFCGSRGGTLPKRNAKGTEPGLALSARDGGMSSAA 600
 GGPQLPGEEGDRSQDVWQWMLERQSKSKPHSAQSIRKSYPLESARAAPGERVSRHHLL 660
 GASGHSRSVARAHFPTQDPAMPPLTPPNTLAQLEEACRRRLAEVSKPQKQRCVASQQORDR 720
 NHSAAGQAGASPFANPSLAPEDHKEPKKLASVHALQASELVVITYFFCGEEIIPYRMLKAQ 780
 SLTLGHFKEQLSKKGNRYRYFFKKASDEFACGRVFEEIWDDDETVLPMYEGRILGKVERID 839

AAATAAGCAGCCGTTTCGCGATGGATTTTCGGGGCCACCCGGAGGCCGAGGCGTCCGCTCCC 60
 CAAAGGAGAGCTTTGCTGTAAAAGAGAGGAGGCTCACATGAGCCCCTGCTGACTTAAGAG 120
 AGACCAAGCCGATTGCTGAGAGGAACTGGAAGAAGAAAAAGGAGGAGGAGGGAAAAAAG 180
 CAAAACAAAATCCAAACTCAGTGAGACGCTCTCCCTCACCATGAGTAGCGCCGTGTTAGT 240
 GACTCTCCTTCCAGATCCCAGCAGCAGCTTCCGCGAGGATGCTCCGCGGCCCGCCGGTTCC 300
 GGGAGAAGAAGGGGAGACCCCCACCGTGTGAGCCTAGTGTGGGCAAGGTCCAGTCCACCAA 360
 ACCTATGCCCGTTTCTCTAATGCTAGGCGGAATGAAGATGGACTGGGGGAGCCCCGAGGG 420
 GCGGGCCTCCCCCGATTCCCTTTGACCAGGTGGACCAAGTCTTTACACTCCTTGTGTTGG 480
TGACCAGGATGGTGCATACCTCTTCCGGACTTCTGAGAGGGAGAAATGTGTGGATAC 540
GCTGGACTTCTGGTTTGCTTGTAAATGGGTTCAGGCAGATGAACCTGAAGGATACCAAAAC 600
TTTGCGAGTGGCCAAAGCAATCTATAAGAGGTACATTGAGAACAACAGCGTTGTCTCCAA 660
GCAGCTGAAGCCCGCCACCAAGACCTACATACGAGATGGCATCAAGAAGCAACAGATCCG 720
CTCGGTCAGTTTGACCAGGCACAGACCGAGATCCAGGCAGTGATGGAGGAAAATGCCTA 780
CCAGGTGTTCTTGACTTCTGACATTTACCTGGAATATGTGAGGAGTGGGGGGAAAAAC 840
 AGCTTACATGAGTAACGGGGGACTGGGGAGCCTAAAGGTCTTATGTGGCTACCTCCCCAC 900
 CTTGAATGAAGAAGAGGAGTGGACGTGTGCCGACCTCAAGTGCAAACCTCTCACCACCGT 960
 GGTGTTGCTTGTCCAGCAAACTCTTCGGGGCCACCGCGAGTGTGAGATCCACGGAAACAGC 1020
 TGAAAACGGATTACAGGTCTTCAAGAGAAGCGACCCAGTCAATCCTTATCACGTAGGTTT 1080
 CGGCTATGTCTTGCACCAGCCACAGTGCCAACGACAGCGAGTTATCCAGCGACGCAT 1140
 GACCGAGCATTCATGTCCATGACGGACAGTAGCGTAGATGGAGTCCCTCCTTACCGCAT 1200
 GGGGAGTAAGAAACAACCTCAGAGAGAGATGCATCGCAGTGTGAAGGCCAATGGCCAAAT 1260
GTCTCTACCTCATTTTTCCGAGAACCACCGCCTGCCCAAGGAGATGACGCCTGTGGAACC 1320
TGCTGCCTTTCGCCGCCGAGCTCATCTCCAGGCTGGAGAACTGAACTGGAGCTGGAAG 1380
CCGCCATAGTCTGGAGGAGCGGCTGCAGCAGATCCGGGAGGATGAAGAAAAGGAGGGGTC 1440
TGAGCAGGCCCTGAGCTCACGGGATGGAGCACCGGTCCAGCACCCCCTGGCCCTCCTACC 1500
TCCGGCAGCTATGAAGAGGACCCACAAACCATTTTGGACGACCACCTCTCCAGGGTCCCTC 1560
AAGACCCCGGCTGTCAATCCCCTGGTGTGGGTTCGCTATAGCCCACGGTCCCGCTCCCCC 1620
 GACCACCACCACGACACCACCATCAGCAGTGTACATACCCTTCTTTGACTGGGGG 1680
 AAGCTGCCCGTGGCTGCTTGCCCCCTCCTTGGAGCAAGAGCTTCTTGACCAACAGAC 1740
 GACGAAGCACGTTACCACCACTACATCCACCACCACGCCGTCCCCAAGACCAAGGAGGA 1800
 GATCGAGGCAGAAGCCACACAGAGAGTCCGCTGCCTCTGTCTTGGGGGAACAGATTATTA 1860
 TTGCTACTCCAAATGCAAAAGCCACCCGAAGGCTCCAGAGCCCCTGCCTGGGGAGCAGTT 1920
 TTGTGGCAGCAGAGGTGGTACCTTGCCAAAACGGAATGCAAAGGGCACCGAACCGGGTCT 1980
 TGCATGTTCGGCCAGGGATGGAGGGATGTCCAGTGCAGCGGGGGGGCCCCAGCTTCCTGG 2040
 GGAAGAAGGAGACCGGTACAGGATGTCTGGCAGTGGATGTTAGAGAGTGAGCGGCAGAG 2100
 CAAGTCCAAGCCCCATAGTGCCCCAAAGCATAAGAAAGAGCTACCCATTGGAGTCTGCCCC 2160
 TGCGGCCCCAGGAGAACGAGTCAGCCGGCACCATCTGTTGGGGGCCAGCGGACACTCCCG 2220
 CTCGGTGGCCCCGGGCTACCCATTTACCCAGGACCCCTGCAATGCCTCCCCTTACCCACC 2280
 CAACACTTTGGCACAGCTAGAGGAAGCCTGCCGAGGCTGGCAGAGGTGTGGAAGCCCCA 2340
 GAAGCAGCGGTGCTGCGTGGCCAGTCAGCAGAGGGACAGGAACCACTCGGCTGCTGGTCA 2400
 GGCAGGAGCCTCACCCCTTCGCCAACCCCAAGCCTGGCTCCAGAAGATCACAAAGAGCCAAA 2460
 GAAACTGGCAAGTGTCCACGCGCTCCAGGCCAGTGAGCTGGTTGTACCTACTTTTTCTG 2520
 TGGAGAAGAAATTCATACAGGAGGATGCTGAAGGCTCAAAGCTTGACCCTGGGCCACTT 2580
 CAAGGAGCAGCTCAGCAAAAAGGGAAATTACAGGTATTATTTCAAGAAGGCGAGTGACGA 2640
 ATTTGCCCTGCGGACGAGTTTTTTGAGGAGATCTGGGACGACGAGACAGTGCTCCCCATGTA 2700
 CGAAGGCAGGATCCTGGGCAAAGTGGAGAGGATCGACTGAGCCTTGGCCTCCTCGGCGTG 2760
 CAACCTGGGCAAGCACCTCGGCGTGCACCATGGAGCCGAAGCCCAGAGACCCTGTCTCAG 2820
 GCCTACGCAACAGCCACGAAATATTCTGAAGGAAAAATGAAACCAATTAAGAAGACAAA 2880
 CTAGGGAGGGACTGGCGCCTGGGCCTTCAGGAGGGCGGGGGTATGTTGATCTTCAGTCTC 2940
 CAGGAGCCTGGGTACCGAGATGAGAAAGCCTGAACTATTTATTAACATGACCACTCTG 3000
 GGCTATAGAAGATGCTCAGTGTGTTGAGAGACTGACATACATAATAGATGACTTCCTAG 3060
 GGTCTGAAATTATAGACTAAGAGAAAACTGTGTATAGCTTGCCCGCACAGGAGTCCCT 3120
 ACTGATATTTATTGAACAGTCGATTCCCCCTACCCGCTCCCTACCCCCCGCCCCGAGT 3180
 TTATGCTGCTTTAAACC 3197

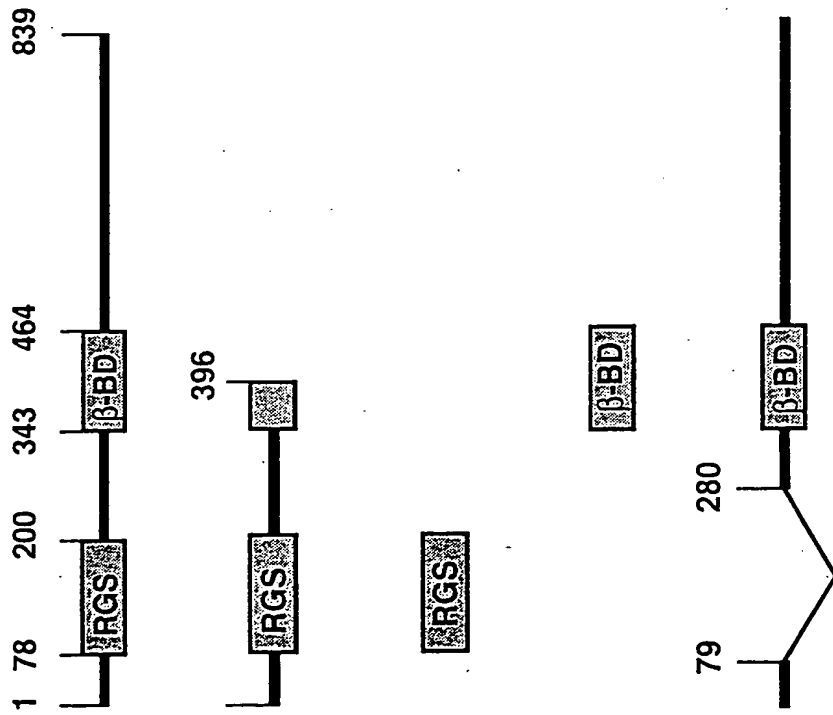
1	5'	-AAATAAGCAGCCGTTTCGCGATGGATTTCGGGGCCACCCGAGGCCGAGGCGTCCGCTCCCCAAAGG	66
67		AGAGCTTTGCTGTAAAAGAGAGGAGGCTCACATGAGCCCCTGCTGACTTAAGAGAGACCAAGC	129
130		CGATTGCTGAGAGGAAGTGAAGAAGAAAAGGAGGAGGGGAAAAAGCAAAACAAAATC	192
193		CAAACCTCAGTGAGACGCTCTCCCTCACCATG AGT AGC GCC GTG TTA GTG ACT CTC	247
1		M S S A V L V T L	9
248		CTT CCA GAT CCC AGC AGC AGC TTC CGC GAG GAT GCT CCG CGG CCC CCG	295
10		L P D P S S S F R E D A P R P P	25
296		GTT CCG GGA GAA GAA GGG GAG ACC CCA CCG TGT CAG CCT AGT GTG GGC	343
26		V P G E E G E T P C Q P S V G	41
344		AAG GTC GAG TCC ACC AAA CCT ATG CCC GTT TCC TCT AAT GCT AGG CGG	391
42		K V Q S T K P M P V S S N A R R	57
392		AAT GAA GAT GGA CTG GGG GAG CCC GAG GGG CGG GCC TCC CCC GAT TCC	439
58		N E D G L G E P E G R A S P D S	73
440		CCT TTG ACC AGG TGG ACC AAG TCT TTA CAC TCC TTG TTG GGT GAC CAG	487
74		P L T R W T K S L H S L L G D O	89
488		GAT GGT GCA TAC CTC TTC CGG ACT TTC CTG GAG AGG GAG AAA TGT GTG	535
90		D G A Y L F R T F L E R E K C V	105
536		GAT ACG CTG GAC TTC TGG TTT GCT TGT AAT GGG TTC AGG CAG ATG AAC	583
106		D T L D F W F A C N G F R O M N	121
584		CTG AAG GAT ACC AAA ACT TTG CGA GTG GCC AAA GCA ATC TAT AAG AGG	631
122		L K D T K T L R V A K A I Y K R	137
632		TAC ATT GAG AAC AAC AGC GTT GTC TCC AAG CAG CTG AAG CCC GCC ACC	679
138		Y I E N N S V V S K Q L K P A T	153
680		AAG ACC TAC ATA CGA GAT GGC ATC AAG AAG CAA CAG ATC GGC TCG GTC	727
154		K T Y I R D G I K K O O I G S V	169
728		ATG TTT GAC CAG GCA CAG ACC GAG ATC CAG GCA GTG ATG GAG GAA AAT	775
170		M F D O A O T E I O A V M E E N	185
776		GCC TAC CAG GTG TTC TTG ACT TCT GAC ATT TAC CTG GAA TAT GTG AGG	823
186		A Y Q V F L T S D I Y L E Y V R	201
824		AGT GGG GGG GAA AAC ACA GCT TAC ATG AGT AAC GGG GGA CTG GGG AGC	871
202		S G G E N T A Y M S N G G L G S	217
872		CTA AAG GTC TTA TGT GGC TAC CTC CCC ACC TTG AAT GAA GAA GAG GAG	919
218		L K V L C G Y L P T L N E E E E	233
920		TGG ACG TGT GCC GAC CTC AAG TGC AAA CTC TCA CCC ACC GTG GTT GGC	967
234		W T C A D L K C K L S P T V V G	249
968		TTG TCC AGC AAA ACT CTT CGG GCC ACC GCG AGT GTG AGA TCC ACG GAA	1015
250		L S S K T L R A T A S V R S T E	265
1016		ACA GCT GAA AAC GGA TTC AGG TCC TTC AAG AGA AGC GAC CCA GTC AAT	1063
266		T A E N G F R S F K R S D P V N	281
1064		CCT TAT CAC GTA GGT TCC GGC TAT GTC TTT GCA CCA GCC ACC AGT GCC	1111
282		P Y H V G S G Y V F A P A T S A	297
1112		AAC GAC AGC GAG TTA TCC AGC GAC GCA CTG ACC GAC GAT TCC ATG TCC	1159
298		N D S E L S S D A L T D D S M S	313
1160		ATG ACG GAC AGT AGC GTA GAT GGA GTC CCT CCT TAC CGC ATG GGG AGT	1207
314		M T D S S V D G V P P Y R M G S	329
1208		AAG AAA CAA CTC CAG AGA GAG ATG CAT CGC AGT GTG AAG GCC AAT GGC	1255
330		K K Q L Q R E M H R S V K A N G	345
1256		CAA GTG TCT CTA CCT CAT TTT CCG AGA ACC CAC CGC CTG CCC AAG GAG	1303
346		Q V S L P H F P R T H R L P K E	361
1304		ATG ACG CCT GTG GAA CCT GCT GCC TTC GCC GCC GAG CTC ATC TCC AGG	1351
362		M T P V E P A A F A E L I S R	377
1352		CTG GAG AAA CTG AAA CTG GAG CTG GAA AGC CGC CAT AGT CTG GAG GAG	1399
378		L E K L K L E L E S R H S L E E	393
		<u>PstI V</u>	
1400		CGG CTG CAG CAG ATC CGG GAG GAT GAA GAA AAG GAG GGG TCT GAG CAG	1447
394		R L Q Q I R E D E K E G S E Q	409
1448		GCC CTG AGC TCA CGG GAT GGA GCA CCG GTC CAG CAC CCC CTG GCC CTC	1495
410		A L S S R D G A P V Q H P L A L	425
1496		CTA CCT CCG GCA GCT ATG AAG AGG ACC CAC AAA CCA TTT TGG ACG ACC	1543
426		L P P A A M K R T H K P F W T T	441

1544	ACC	TCT	CCA	GGG	TCC	TCA	AGA	CCC	CCG	GCT	GTC	AAT	CCC	CTG	GTG	TGG	1591
442	T	S	P	G	S	S	R	P	P	A	V	N	P	L	V	W	457
1592	GTC	GCT	ATA	GCC	CAC	GGT	CCC	GCT	CCC	CCG	ACC	ACC	ACC	ACC	AGC	ACC	1639
458	V	A	I	A	H	G	P	A	P	P	T	T	T	T	S	T	473
1640	ACC	ACC	ATC	AGC	AGT	GTC	ATA	CCC	TTC	TTT	CGA	CTG	GGG	GCA	AGC	TGC	1687
474	T	T	I	S	S	V	I	P	F	F	R	L	G	A	S	C	489
1688	CCC	GTG	GCT	GCT	TGC	CCC	CTC	CTT	GGA	GGC	AAG	AGC	TTC	CTG	ACC	AAA	1735
490	P	V	A	A	C	P	L	L	G	G	K	S	F	L	T	K	505
1736	CAG	ACG	ACG	AAG	CAC	GTT	CAC	CAC	CAC	TAC	ATC	CAC	CAC	CAC	GCC	GTC	1783
506	Q	T	T	K	H	V	H	H	H	Y	I	H	H	H	A	V	521
1784	CCC	AAG	ACC	AAG	GAG	GAG	ATC	GAG	GCA	GAA	GCC	ACA	CAG	AGA	GTC	CGC	1831
522	P	K	T	K	E	E	I	E	A	E	A	T	Q	R	V	R	537
1832	TGC	CTC	TGT	CCT	GGG	GGA	ACA	GAT	TAT	TAT	TGC	TAC	TCC	AAA	TGC	AAA	1879
538	C	L	C	P	G	G	T	D	Y	Y	C	Y	S	K	C	K	553
1880	AGC	CAC	CCG	AAG	GCT	CCA	GAG	CCC	CTG	CCT	GGG	GAG	CAG	TTT	TGT	GGC	1927
554	S	H	P	K	A	P	E	P	L	P	G	E	Q	F	C	G	569
1928	AGC	AGA	GGT	GGT	ACC	TTG	CCA	AAA	CGG	AAT	GCA	AAG	GGC	ACC	GAA	CCG	1975
570	S	R	G	G	T	L	P	K	R	N	A	K	G	T	E	P	585
1976	GGT	CTT	GCA	CTG	TCG	GCC	AGG	GAT	GGA	GGG	ATG	TCC	AGT	GCA	GCG	GGG	2023
586	G	L	A	L	S	A	R	D	G	G	M	S	S	A	A	G	601
2024	GGC	CCC	CAG	CTT	CCT	GGG	GAA	GAA	GGA	GAC	CGG	TCA	CAG	GAT	GTC	TGG	2071
602	G	P	Q	L	P	G	E	E	G	D	R	S	Q	D	V	W	617
2072	CAG	TGG	ATG	TTA	GAG	AGT	GAG	CGG	CAG	AGC	AAG	TCC	AAG	CCC	CAT	AGT	2119
618	Q	W	M	L	E	S	E	R	Q	S	K	S	K	P	H	S	633
2120	GCC	CAA	AGC	ATA	AGA	AAG	AGC	TAC	CCA	TTG	GAG	TCT	GCC	CGT	GCG	GCC	2167
634	A	Q	S	I	R	K	S	Y	P	L	E	S	A	R	A	A	649
2168	CCA	GGA	GAA	CGA	GTC	AGC	CGG	CAC	CAT	CTG	TTG	GGG	GCC	AGC	GGA	CAC	2215
650	P	G	E	R	V	S	R	H	H	L	L	G	A	S	G	H	665
2216	TCC	CGC	TCG	GTG	GCC	CGG	GCT	CAC	CCA	TTT	ACC	CAG	GAC	CCT	GCA	ATG	2263
666	S	R	S	V	A	R	A	H	P	F	T	Q	D	P	A	M	681
2264	CCT	CCC	CTT	ACC	CCA	CCC	AAC	ACT	TTG	GCA	CAG	CTA	GAG	GAA	GCC	TGC	2311
682	P	P	L	T	P	P	N	T	L	A	Q	L	E	E	A	C	697
2312	CGC	AGG	CTG	GCA	FAG	GTG	TCG	AAC	CCC	CAG	AAG	CAG	CGG	TGC	TGC	GTG	2359
698	R	R	L	A	E	V	S	K	P	Q	K	Q	R	C	C	V	713
2360	GCC	AGT	CAG	CAG	AGG	GAC	AGG	AAC	CAC	TCG	GCT	GCT	GGT	CAG	GCA	GGA	2407
714	A	S	Q	Q	R	D	R	N	H	S	A	A	G	Q	A	G	729
2408	GCC	TCA	CCC	TTC	GCC	AAC	CCA	AGC	CTG	GCT	CCA	GAA	GAT	CAC	AAA	GAG	2455
730	A	S	P	F	A	N	P	S	L	A	P	E	D	H	K	E	745
2456	CCA	AAG	AAA	CTG	GCA	AGT	GTC	CAC	GCG	CTC	CAG	GCC	AGT	GAG	CTG	GTT	2503
746	P	K	K	L	A	S	V	H	A	L	Q	A	S	E	L	V	761
2504	GTC	ACC	TAC	TTT	TTC	TGT	GGA	GAA	GAA	ATT	CCA	TAC	AGG	AGG	ATG	CTG	2551
762	V	T	Y	F	F	C	G	E	E	I	P	Y	R	R	M	L	777
2552	AAG	GCT	CAA	AGC	TTG	ACC	CTG	GGC	CAC	TTC	AAG	GAG	CAG	CTC	AGC	AAA	2599
778	K	A	Q	S	L	T	L	G	H	F	K	E	Q	L	S	K	793
2600	AAG	GGA	AAT	TAC	AGG	TAT	TAT	TTC	AAG	AAG	GCG	AGT	GAC	GAA	TTT	GCC	2647
794	K	G	N	Y	R	Y	Y	F	K	K	A	S	D	E	F	A	809
2648	TGC	GGA	CGA	GTT	TTT	GAG	GAG	ATC	TGG	GAC	GAC	GAG	ACA	GTG	CTC	CCC	2695
810	C	G	R	V	F	E	E	I	W	D	D	E	T	V	L	P	825
				BamHI	V												
2696	ATG	TAC	GAA	GGC	AGG	ATC	CTG	GGC	AAA	GTG	GAG	AGG	ATC	GACT	GAGCCTT		2745
826	M	Y	E	G	R	I	L	G	K	V	E	R	I	D			839
2746	GGCCTCCTCGGCGTGCAACCTGGGCAAGCACCTCGGCGTGCAACCATGGAGCCGGAAGCCCGAG																2808
2809	ACCCTGTCTCAGGCGTACGCAACAGCCACGAAATATTCTGAAGGAAATGAAACCAATTAGA																2871
2872	AGACAAAGCCCTAGGGAGGACTGGCGCTTGGGCGCTTCAAGGAGGGCGGGGTATGTTGATCTTC																2934
2935	AGTCTCCAGGAGCCTGGGTACCGAGATGAGAAAGCCTGAACTATTTATTAACATGACCACT																2997
2998	CTGGGCTATAGAAGATGCTCAGTGTGTTTGAGAGACTGACATACATAATAGATGACTTCCTAG																3060
3061	GGTTCTGAAATTCATAGACTAAGAGAAAACCTGTGTATAGCTTGCCCGCACAGGAGTCCTTACT																3123
3124	GATATTTTATGAACAGTCGATTCCCCCTACCCGCTCCCTACCCCCCGCCCCGAGTTTATGC																3186
3187	TGCTTTAAACC -3'																3197

Conductin Konstrukte

Interaktion mit β -Catenin (β -Galactosidase Einheiten)

Abbau von β -Catenin in SW480 Zellen



ja

nein

nein

nein

ja

220

0

0

44

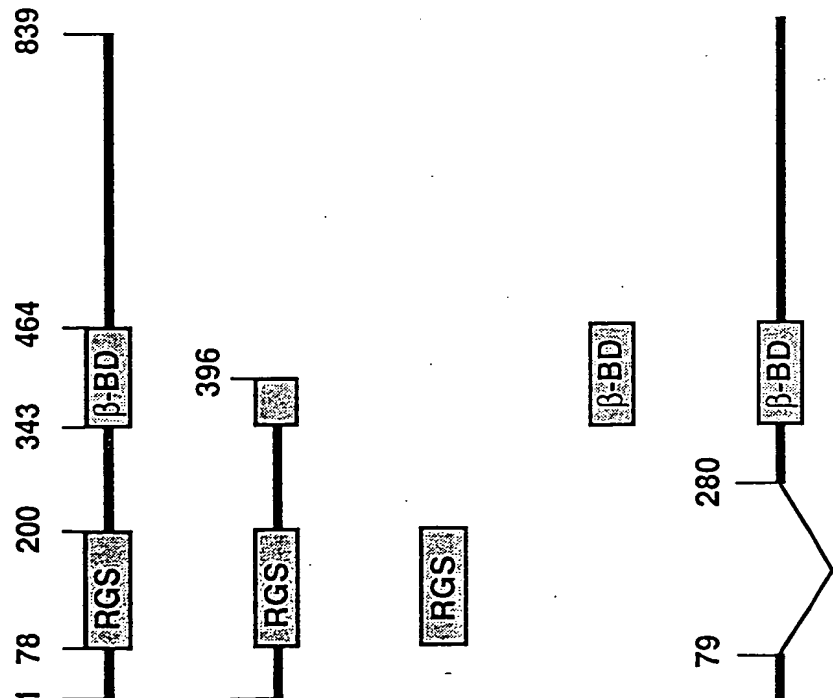
490

Abb. 4

Conductin
Konstrukte

Interaktion mit
APC-Fragmenten
(β -Galactosidase Einheiten)

APC Fr. 1 APC Fr. 2



6	9
110	250
390	390
0	0
0	0

Abb. 5

17